

运用 AP-PCR 对中国慈姑属内亲缘关系的研究*

杜光伟 易清明

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

陈家宽

(复旦大学生物多样性研究所 上海 200433)

PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF CHINESE SAGITTARIA SPECIES (ALISMATACEAE) BASED ON AP-PCR ANALYSIS

DU Guang-Wei YI Qing-Ming

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

CHEN Jia-Kuan

(Fudan Institute of Biodiversity Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract The arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) technique was applied to the analysis of the phylogenetic relationships among species of Chinese *Sagittaria* except *S. natans* which is not included in this study. One hundred and twenty-seven polymorphism DNA fragments were generated by ten arbitrarily primers and used to calculate the genetic distance. A phylogenetic dendrogram was constructed based on genetic distance by UP-GMA method. The results show that Chinese *Sagittaria* can be divided into three groups, which are composed of seven species and three varieties or forms except *S. natans*. The three groups are: group I, with only one species *S. guayanensis*; group II, composed of *S. tengtsungensis*, *S. wuyiensis*, *S. lichuanensis* and *Sagittaria* sp.; group III, *S. potamogetifolia*, *S. pygmaea*, *S. trifolia* var. *trifolia*, *S. trifolia* var. *sinensis*, *S. trifolia* f. *longiloba*. Results of the present study are congruent with those based on morphological and karyotypical ones.

Key words AP-PCR; Chinese *Sagittaria*; Molecular systematics

摘要 用 AP-PCR 技术测定了中国慈姑属植物基因组 DNA 的多态性,以其为分子性状用 UPGMA 方法聚类,结果表明:中国慈姑属植物可分为 3 大类,包括 7 种 3 变种或变型(未包括浮叶慈姑)。本文的结果与基于形态和核型分析的结果一致。

关键词 AP-PCR; 中国慈姑属; 分子系统学

慈姑属 *Sagittaria* L. 是泽泻科 Alismataceae 的一个重要属,为世界性分布,目前已知约为 30 种。一般认为泽泻科是现存的最古老、最原始的单子叶植物分类群之一。因此,慈姑属的系统学研究对了解单子叶植物的起源具有重要意义。

分类学家们对慈姑属植物的认识已有很长历史。自林奈建立慈姑属起,多位学者对慈姑属作了修定(Rataj, 1973, 1972; Bogin, 1955)。使慈姑属植物的分类大为改观,但同

* 国家自然科学基金资助。

1997-02-01 收稿, 1998-01-07 收修稿。

时也还存在一些有争议的问题,如有的学者认为慈姑属应当分为慈姑亚属和冠果草亚属(陈家宽,1989; Rataj, 1973, 1972; Bogin, 1955),或在属下不设亚属(孙祥钟,1992; Chafoor, 1974);另外一些学者则认为应设慈姑属和冠果草属(Cook, 1990; Small, 1909)。至于中国的慈姑属植物,直到 1952 年才开始有人整理,后经多年研究,渐至完善(颜素珠,1993;孙祥钟,1992;陈家宽,1989;裴鉴,单人骅,1952),但在中国慈姑属的分类问题上,同样存在不尽相同的意见。

近几年来,由 Williams 和 Welsh 创立的使用随机引物的 PCR, RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)(Williams, 1990)或 AP-PCR(Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction)(Welsh, 1990)广泛应用于基因定位、基因克隆、物种分类及进化研究、作物育种、遗传资源评估、生物防治等各个方面。这两种技术在本质上没有什么区别,只是 RAPD 一般使用 10 nt 的引物,而 AP-PCR 使用的引物长度一般为 20~30 nt。本研究同时使用了长度为 10 nt 和 20 nt 左右的引物,用 PCR 产生的 DNA 分子标记作为性状来研究中国慈姑属植物的亲缘关系。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用材料见表 1。

表 1 材料来源
Table 1 Origin of the materials used in this study

编号 Number	分类群 Taxa	来源 Origin	凭证标本 Voucher
1	长喙毛茛泽泻 <i>Ranalisma rostrata</i> Stepf.	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	Q. F. Wang(王青锋)W003
2	腾冲慈姑 <i>Sagittaria tengtsungensis</i> H. Li	Tengchong, Yunnan(云南腾冲)	Q. F. Wang(王青锋)W070
3	冠果草 <i>S. guayanensis</i> ssp. <i>lappula</i> (D. Don)Bogin	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	Q. F. Wang(王青锋)W002
4	武夷慈姑 <i>S. wuyiensis</i> J K Chen <i>et al.</i>	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	Q. F. Wang(王青锋)W13
5	未定种 <i>Sagittaria</i> sp.	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	J. K. Chen(陈家宽)94071
6	利川慈姑 <i>S. lichuanensis</i> J K Chen <i>et al.</i>	Lichuan, Hubei(湖北利川)	J. K. Chen(陈家宽)0123a
7	小慈姑 <i>S. potamogetifolia</i> Merr.	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	Q. F. Wang(王青锋)W011
8	矮慈姑 <i>S. pygmaea</i> Miq.	Wuhan, Hubei(湖北武汉)	Q. F. Wang(王青锋)0043
9	慈姑 <i>S. trifolia</i> var. <i>trifolia</i>	Wuhan, Hubei(湖北武汉)	J. K. Chen(陈家宽)0012
10	长瓣慈姑 <i>S. trifolia</i> f. <i>longiloba</i> (Turr.)Makino	Wuhan, Hubei(湖北武汉)	J. K. Chen(陈家宽)0002
11	华夏慈姑 <i>S. trifolia</i> var. <i>sinensis</i> (Sims)Makino	Nanning, Guangxi(广西南宁)	J. K. Chen(陈家宽)栽培

1.2 引物

从中国科学院上海细胞生物研究所获得,引物序列见表2。

1.3 DNA 的分离

从植株上取新鲜叶片,按 Hu 的方法(Hu & Quios,1991) 提取 DNA。

1.4 DNA 扩增和数据分析

按我们以前报道的方法进行(Yi *et al.*,1995)。

表2 用于 PCR 扩增慈姑 DNA 的引物
Table 2 Primers used for PCR amplification of *Sagittaria* DNA

编号 * primer number	序列 Sequence (5'-3')
1	5'CGGCGGCAGGTCCACGGTC3'
2	5'CCTGATGCCACGTGTAGC3'
3	5'CTGTAGCGGTCCCGTTGCTGCGGTG3'
4	5'AACTGGTCTGTCCTCCACTGTCTGTC3'
5	5'GCOGGATTATTCATACCGTAC3'
6	5'CGACAAGCTTCATCGTGTGGG3'
7	5'GAAACGGGTG3'
8	5'GTTTGTCTCC3'
9	5'GACGGATCAG3'
10	5'ACGGATCCTG3'

* 编号同表1。

For the numbers listed, see Table 1.

2 结果和讨论

表3 中国慈姑属植物之间的遗传距离矩阵

Table 3 Matrix of genetic distance measures among species of Chinese *Sagittaria* estimated from amplified fragments data

编号 * material number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0										
2	0.50	0									
3	0.58	0.48	0								
4	0.56	0.36	0.46	0							
5	0.57	0.41	0.46	0.15	0						
6	0.51	0.43	0.49	0.25	0.21	0					
7	0.56	0.47	0.46	0.44	0.42	0.37	0				
8	0.57	0.44	0.55	0.47	0.49	0.45	0.43	0			
9	0.60	0.40	0.47	0.46	0.47	0.43	0.33	0.35	0		
10	0.57	0.42	0.48	0.44	0.46	0.44	0.33	0.36	0.03	0	
11	0.56	0.47	0.53	0.42	0.44	0.44	0.33	0.42	0.16	0.14	0

* 编号同表1。

For the numbers listed, see Table 1.

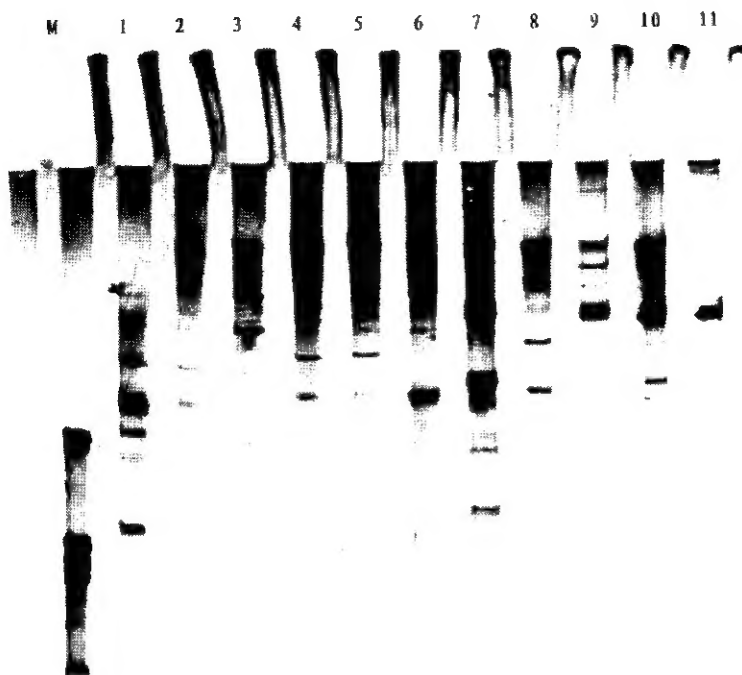


图 1 中国慈姑属和长喙毛茛泽泻的 AP-PCR 扩增产物电泳图谱。引物为 C15。

Fig. 1 AP-PCR amplification of Chinese *Sagittaria* and *Ranalisma* using C15 as primer.

M: Molecule weight marker, pGEM-7Z(+)/HaeIII. The numbers are same as those in the Table 1.

2.1 中国慈姑属植物的分类

我们用 10 个引物,通过 PCR,对中国慈姑属植物及其近缘种长喙毛茛泽泻的基因组 DNA 进行扩增,将扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,共获得 127 个多态性 DNA 片段(图 1,图 2)。胶上某一位置的 DNA 带记为“1”,同一位置未出现 DNA 带则记为“0”,据此计算遗传距离表(表 3),利用 UPGMA 法构建聚类图(图 1)。从聚类图(图 1)可看出,长喙毛茛泽泻由于与慈姑属为不同属而单独成为一类。中国慈姑属植物可划分为 3 大类:Ⅰ类为冠果草一种,与所有其他慈姑属植物相似性较小,该种是整个慈姑属已知分类群中最为原始的植物;Ⅱ类包括腾冲慈姑、武夷慈姑、利川慈姑 3 个种及未鉴定的 *Sagittaria* sp.,这一类为Ⅰ类和Ⅲ类之间的过渡类型;Ⅲ类包括了小慈姑、矮慈姑、慈姑、华夏慈姑、长瓣慈姑。根据图 1 所划的结合线 l_1 ,可将武夷慈姑与利川慈姑划为一个种,但考虑以下事实,我们认为将武夷慈姑作为一独立的种更合适,即:(A)虽然武夷慈姑与利川慈姑之间的遗传距离较小,仅为 0.25,但其与慈姑属中其余各典型种之间的平均遗传距离为 0.44,这等于慈姑属植物各已知种之间的平均遗传距离。也就是说,与中国慈姑属内其他各种相比,武夷慈姑在基因组结构的差异达到了种级水平。还应看到武夷慈姑与腾冲慈姑之间的遗传距离也只有 0.36,说明武夷慈姑与利川慈姑、腾冲慈姑在系统发育上有较近的亲缘关系。(B)武夷慈姑与利川慈姑的核型不同,后者第一对染色体的中部着丝点不配对。(C)武夷慈姑与利川慈姑的繁育系统也有差异,前者兼具有性生殖和无

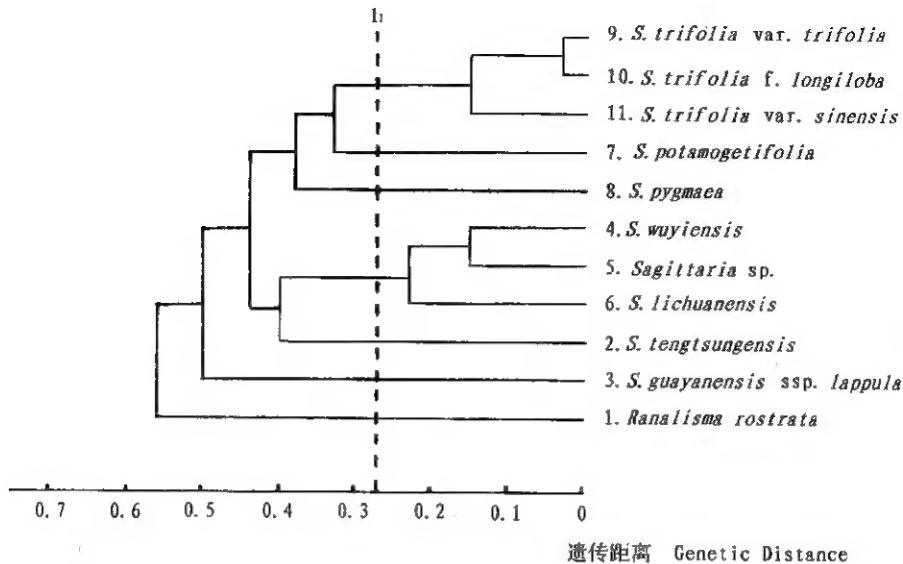


图 2 基于分子标记分析的中国慈菇属植物的聚类图
Fig. 2 A dendrogram demonstrating the relationships among species of Chinese *Sagittaria* based on genetic distances between species.

性生殖,后者仅有无性生殖。(D)两者在地理分布上有间断,武夷慈菇分布于武夷山附近,利川慈菇仅分布于湖北利川。另外,慈菇与华夏慈菇和长瓣慈菇之间的平均遗传距离很小,仅为 0.11,因此将华夏慈菇和长瓣慈菇视为慈菇的变种及变型是合理的。考虑到未鉴定过的 *Sagittaria* sp. 与武夷慈菇之间的遗传距离较小,只有 0.15,可将其作为武夷慈菇的一个变型。Bogin(1955)和 Rataj(1972)等认为小慈菇为 *S. pygmaea* 和 *S. trifolia* 杂交产物,我们的结果不支持这一观点。相反,我们认为小慈菇是一个独立的种,因为它与慈菇属植物各已知种之间的平均遗传距离为 0.41,此值还大于慈菇与慈菇属植物各已知种之间的平均遗传距离 0.40。综上所述,DNA 水平上的分子证据表明,除本研究因故未取样的浮叶慈菇外,中国慈菇属植物包括 7 个种(冠果草,腾冲慈菇,利川慈菇,武夷慈菇,小慈菇,矮慈菇,慈菇)3 个变种或变型(华夏慈菇,长瓣慈菇和 *Sagittaria* sp.)。这一结论与陈家宽(1989)根据形态特征和核型分析所得的分类结果一致。

参 考 文 献

- 孙祥钟,1992. 中国植物志. 第 8 卷. 北京:科学出版社
 陈家宽,1989. 中国慈菇属的系统与进化植物学研究. 武汉:武汉大学出版社
 钟扬,陈家宽,邹洪才,1992. 中国慈菇属系统发育的研究. 武汉植物学研究, 10(3):243~248
 钟扬,陈家宽,黄德世,1990. 数量分类的方法与程序. 武汉:武汉大学出版社
 裴鉴,单人骅,1995. 华东水生维管束植物. 北京:中国科学院
 颜素珠,1983. 中国水生植物图说. 北京:科学出版社
 戴灼华,刘凤丽,1994. *Drosophila auraria* 复合种的进化遗传学研究——分支分析与数值分析(下). 遗

传学报, 21(6): 436~440

Bogin C, 1955. Revision of the genus *Sagittaria* (Alismataceae). Mem N Y Bot Gard, 9(2): 179~233

Chaffoor A, 1974. Alismataceae. In: Fl W Park, 68: 1~12

Cook C D K, 1990. Aquatic Plant Book. The Hague: SPB Academic Publishing

Hu J, Quiros C F, 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Rep, 10: 505~511

Rataj K, 1972. Revision of the genus *Sagittaria* I. Old world species. Annot Zool Bot, 76: 1~31

Rataj K, 1973. Revision of the genus *Sagittaria* II. The species of West Indies, Central and South America. Annot Zool Bot, 78: 1~61

Small J K, 1909. Alismaceae N Am Flora. 17(1): 48~62

Welsh J, McClelland M, 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res, 18: 7213~7218

Williams J G K, Kubelik A E, Levar K J *et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 18: 6531~6535

Yi Q M, Deng W G, Xia Z P *et al.*, 1995. Polymorphism and genetic relatedness among wild and cultivated rice species determined by AP-PCR analysis. Hereditas, 122: 135~141